

マウス肺炎球菌感染におけるTNF- α 産生Gr-1陽性細胞の解析

著者	丹野 大樹, 八田 益充, 青柳 哲史, 山本 夏男, 石井 恵子, 賀来 満夫, 川上 和義
雑誌名	東北大学医学部保健学科紀要
巻	19
号	1
ページ	13-22
発行年	2010-01-31
URL	http://hdl.handle.net/10097/42223

マウス肺炎球菌感染における TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の解析

丹野大樹¹, 八田益充², 青柳哲史², 山本夏男²,
石井恵子¹, 賀来満夫², 川上和義¹

¹東北大学大学院医学系研究科 感染分子病態解析学分野

²東北大学大学院医学系研究科 感染制御・検査診断学分野

Analysis of TNF- α -producing Gr-1⁺ Cells in Pulmonary Infection with *Streptococcus pneumoniae* in Mice

Daiki TANNO¹, Masumitsu HATTA², Tetsuji AOYAGI², Natsuo YAMAMOTO²,
Keiko ISHII¹, Mitsuo KAKU² and Kazuyoshi KAWAKAMI¹

¹Department of Medical Microbiology, Mycology and Immunology,
Tohoku University Graduate School of Medicine

²Department of Infection Control and Laboratory Diagnostics, Internal Medicine,
Tohoku University Graduate School of Medicine

Key words: pneumococcal infection, neutrophils, Gr-1⁺ cells, TNF- α

Tumor necrosis factor (TNF)- α plays an important role in the accumulation of neutrophils in the lungs infected with *Streptococcus pneumoniae*. This cytokine also act to promote the killing activity of neutrophils against infectious microorganisms. Previously, we have demonstrated that Gr-1⁺ cells contribute to the synthesis of TNF- α , in addition to macrophages, in lungs after infection with *S. pneumoniae*. However, it remains to be elucidated how TNF- α -producing Gr-1⁺ cells are accumulated in lungs after this infection, and therefore, in this study, we addressed this issue. In a flow cytometric analysis, TNF- α ⁺ Gr-1⁺ cells were increased in spleen and bone marrow after 12h pulmonary infection with *S. pneumoniae*. These cells were increased in bone marrow cells 24h after *in vitro* culture with *S. pneumoniae*, whereas such increase was not observed in spleen cells. Interestingly, TNF- α levels in the culture supernatants were not detected in both spleen cells and bone marrow cells upon *in vitro* stimulation with this bacterium. These results suggest that TNF- α -producing Gr-1⁺ cells accumulating in the lungs may be originated from bone marrow and that these cells may secrete TNF- α only at the site of infection.

はじめに

肺炎は本邦における死亡原因の第4位に挙げられ、肺炎球菌は市中肺炎の起因菌として最も高頻

度に検出される。グラム陽性双球菌として知られる肺炎球菌は、耳鼻科領域の感染症や髄膜炎においても重要な原因菌であり、小児や高齢者、慢性心肺疾患、エイズ、脾摘患者などでは、侵襲性感

染症を引き起こすため、臨床上極めて問題となっている^{1,2)}。また、近年では薬剤耐性肺炎球菌感染症の増加なども見られることから³⁾、肺炎球菌に対する予防の重要性は大きく、感染防御機構の解明は急務である。

現在、肺炎球菌性肺炎の防御機構には肺胞腔内への好中球浸潤が大きく関与し、主に好中球によって産生される活性酸素種が肺炎球菌排除の役割を担っていると考えられている⁴⁾。好中球浸潤には、マクロファージ炎症タンパク(MIP)-2^{5,6)}や腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor: TNF)- α などが関係しており、特にTNF- α は感染局所での細胞接着分子の発現を高め、好中球と血管内皮細胞の結合を強固にすることで好中球の集積を促進している^{7,8)}。さらに、TNF- α は好中球の殺菌能も高めることが知られており^{9,10)}、実際に肺炎球菌感染マウスに抗TNF- α 中和抗体を投与すると好中球浸潤が弱まり、数日のうちに全例が死亡するという報告もされている^{11,12)}。TNF- α は様々なToll様受容体リガンドの刺激によってマクロファージや樹状細胞から放出されることは知られているが¹³⁾、肺炎球菌感染における肺内のTNF- α 産生細胞については未だ十分には明らかにされていない。

これまでに我々は、マウスにおける肺炎球菌感染後の肺内TNF- α 産生がマクロファージのみならず、好中球の表面マーカーであるGr-1を発現した細胞によっても担われていることを見出してきた¹⁴⁾。そこで本研究では、肺炎球菌感染後に肺内に集積するGr-1陽性細胞の起源を明らかにすることを目的とし、脾臓や骨髄中におけるこれら細胞について、フローサイトメトリー解析を用いて検証した。

材料および方法

1. 使用菌株

肺炎球菌臨床分離株(URF918; serotype3)をTodd-Hewitt broth (Difco, Detroit, MI, USA)で37°C、5%CO₂インキュベータ内で6時間培養し増菌した。この菌液をリン酸緩衝液(phosphate-buffered saline: PBS)で2回洗浄したの

ち、PBSに懸濁したものを接種菌液とした。

2. 肺炎球菌性マウス肺炎モデル

東北大学大学院医学系研究科付属動物実験施設から得た成熟C57BL/6マウス(6~8週齢)に肺炎球菌臨床分離株URF918を 2×10^6 CFU/mouseで気管内投与することによりマウス肺炎モデルを作製した。このマウス肺炎モデルにおいて、通常、マウスが死亡することはないが、まれに肺炎球菌感染後7日までに17%のマウスが死亡することが確認されている¹⁴⁾。これらの実験はすべて、東北大学動物実験委員会の承認のもとに行った。

3. 細胞培養

C57BL/6マウスから脾臓および骨髄を採取し、10% FCSと50 μ M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml ペニシリンG-100 μ g/ml ストレプトマイシン(Sigma, St Louis, MO, USA)を添加したRPMI 1640 メディウム(Nipro, Osaka, Japan)を用いて単離細胞浮遊液を調整した。その後、 1×10^6 /mlの脾細胞あるいは骨髄細胞を、肺炎球菌菌液(MOI 1, MOI 3)やLipopolysaccharide (LPS: Sigma) (1 μ g/ml)と共に37°C、5% CO₂下で24時間静置培養を行った。

4. フローサイトメトリー解析

1) モノクローナル抗体

ハイブリドーマ(clone 2.4G2)の培養上清から抗Fc γ レセプター抗体を作製して使用した¹⁴⁾。また、FITC標識抗TNF- α 抗体(clone MP6-XT22, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), PE標識抗Gr-1抗体(clone RB6-8C5, BD Biosciences), 対照としてFITCまたはPE標識アイソタイプコントロール・ラットIgGを用いた。

2) モノクローナル抗体による染色と解析

調製した脾臓・骨髄の単離細胞浮遊液あるいは培養細胞から 2×10^5 個の細胞を、抗Fc γ レセプター抗体(2 μ g/ml)と4°Cで15分反応させたのち、PE標識抗Gr-1抗体で細胞表面を染色した。その後、cytofix/cytoperm (BD Biosciences)と反応させ、FITC標識抗TNF- α 抗体で細胞内TNF- α を染色した。測定はフローサイトメトリー(Cytomics FC500, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)を用い、細胞数を30,000個

カウントして陽性細胞比率を求めた。

5. サイトカイン測定

脾細胞および骨髓細胞を肺炎球菌菌液 (MOI 1, MOI 3) や LPS (1 μ g/ml) と 24 時間共培養し、培養上清中の TNF- α を、ELISA 法 (BD Biosciences) を用いて測定した。

結 果

1. 肺炎球菌感染による脾臓、骨髓での TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の増加

これまでの検討で、我々は、肺炎球菌感染後 12 時間をピークに肺内に TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が集積してくることを確認している¹⁴⁾。そこで、肺炎球菌感染によって肺内に集積してくるこれら TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞がどこで分化・増殖しているかを調べるために、造血組織である脾臓

と骨髓について以下の実験を行った。

① 肺炎球菌未感染のマウスと肺炎球菌感染後 12 時間のマウスからそれぞれ脾細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。肺炎球菌未感染のマウスから採取した脾細胞では TNF- α を産生している Gr-1 陽性細胞は 2.93% であるが、肺炎球菌感染 12 時間後のマウスから採取した脾細胞では TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が 13.4% と著明な増加がみられた (図 1)。実験は各群 3 匹で行い、データはそのうちの代表的なものを用いた。

② 同様に、肺炎球菌未感染と肺炎球菌感染後 12 時間のマウスからそれぞれ骨髓細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて解析を行ったところ、肺炎球菌未感染のマウスから採取した骨髓細胞では TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞は 3.2% とほ

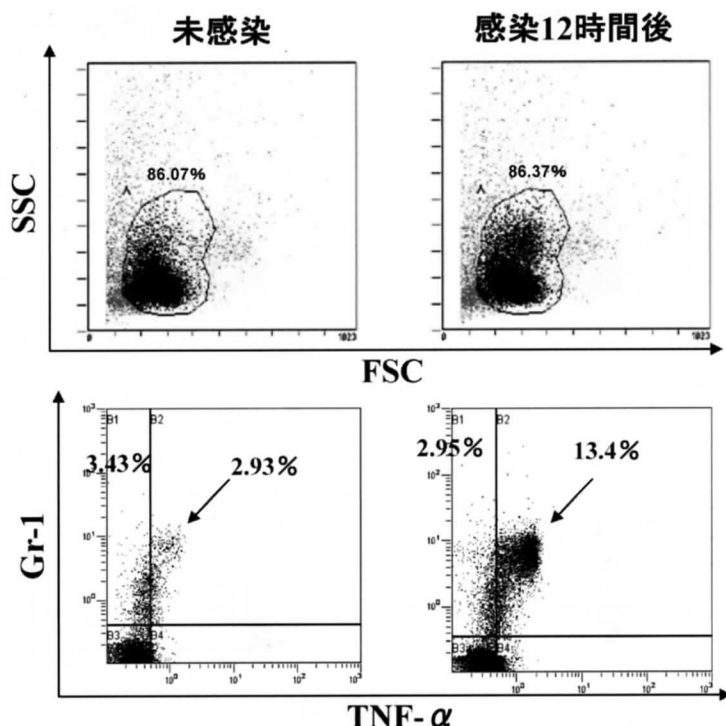


図 1. 肺炎球菌感染前後の脾細胞におけるフローサイトメトリー解析

肺炎球菌未感染のマウスと肺炎球菌感染後 12 時間のマウスからそれぞれ脾細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて FSC/SSC において線で囲んだ領域にゲートをかけて解析を行った。下段の数字はゲート内における割合 (%) を示す。

とんど存在していなかったが、肺炎球菌感染 12 時間後のマウスから採取した骨髓細胞では 41.1% の TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が存在していた (図 2)。実験は各群 3 匹で行い、データはそのうちの代表的なものを用いた。

肺炎球菌を気道に感染させているにも関わらず、脾細胞、骨髓細胞でも肺と同様の TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が増加することから、肺に集積してくるこれら細胞は脾臓あるいは骨髓で分化・増殖している可能性があることが示唆された。

2. 肺炎球菌刺激による脾細胞、骨髓細胞中の TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の変化

次に、肺炎球菌未感染のマウスから脾細胞、骨髓細胞を採取し、*in vitro* で肺炎球菌刺激を行い、*in vivo* と同様の結果が得られるかどうかを確かめた。肺炎球菌を添加したサンプルで、TNF- α 、

Gr-1 とともに陰性の集団が斜めに線状に伸びているが、死細胞と考え、その部分をゲートから外し解析を行った。脾細胞では肺炎球菌刺激において *in vivo* で見られたような TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の増加は見られなかった (図 3)。しかし、骨髓細胞では肺炎球菌の MOI 3 刺激で *in vivo* と同様の TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の明らかな増加が見られた (図 4)。

骨髓細胞では *in vitro* と *in vivo* で同様の結果が得られたことから、肺炎球菌感染における TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の起源は脾臓ではなく骨髓であることが示唆された。

3. 肺炎球菌刺激による脾細胞、骨髓細胞からの TNF- α 産生

最後に、結果 2 の実験で肺炎球菌刺激を受けた脾細胞、骨髓細胞の培養上清中の TNF- α 濃度を

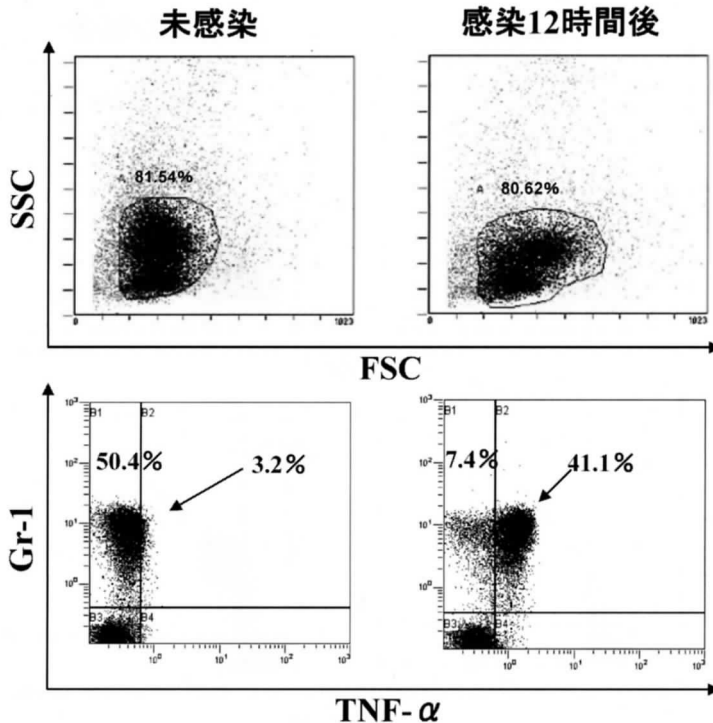


図 2. 肺炎球菌感染前後の骨髓細胞におけるフローサイトメトリー解析
肺炎球菌未感染のマウスと肺炎球菌感染後 12 時間のマウスからそれぞれ骨髓細胞を採取し、フローサイトメトリーを用いて FSC/SSC において線で囲んだ領域にゲートをかけて解析を行った。下段の数字はゲート内における割合 (%) を示す。

測定したところ、驚くべきことに肺炎球菌刺激ではその培養上清中に TNF- α は検出されなかった(図 5A, B)。TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の増加が見られた骨髄細胞の MOI 3 刺激でも、その培養上清中に TNF- α が検出されなかったことから、TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞は TNF- α を細胞内に蓄えるのみで、細胞外に放出しているわけ

ではないことがわかった。

考 察

今回の研究で我々は、肺炎球菌感染防御に重要な役割を担っている TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が、肺炎球菌の気管内感染により骨髄で分化・増殖し、その後感染局所(肺)に集積する可能性が

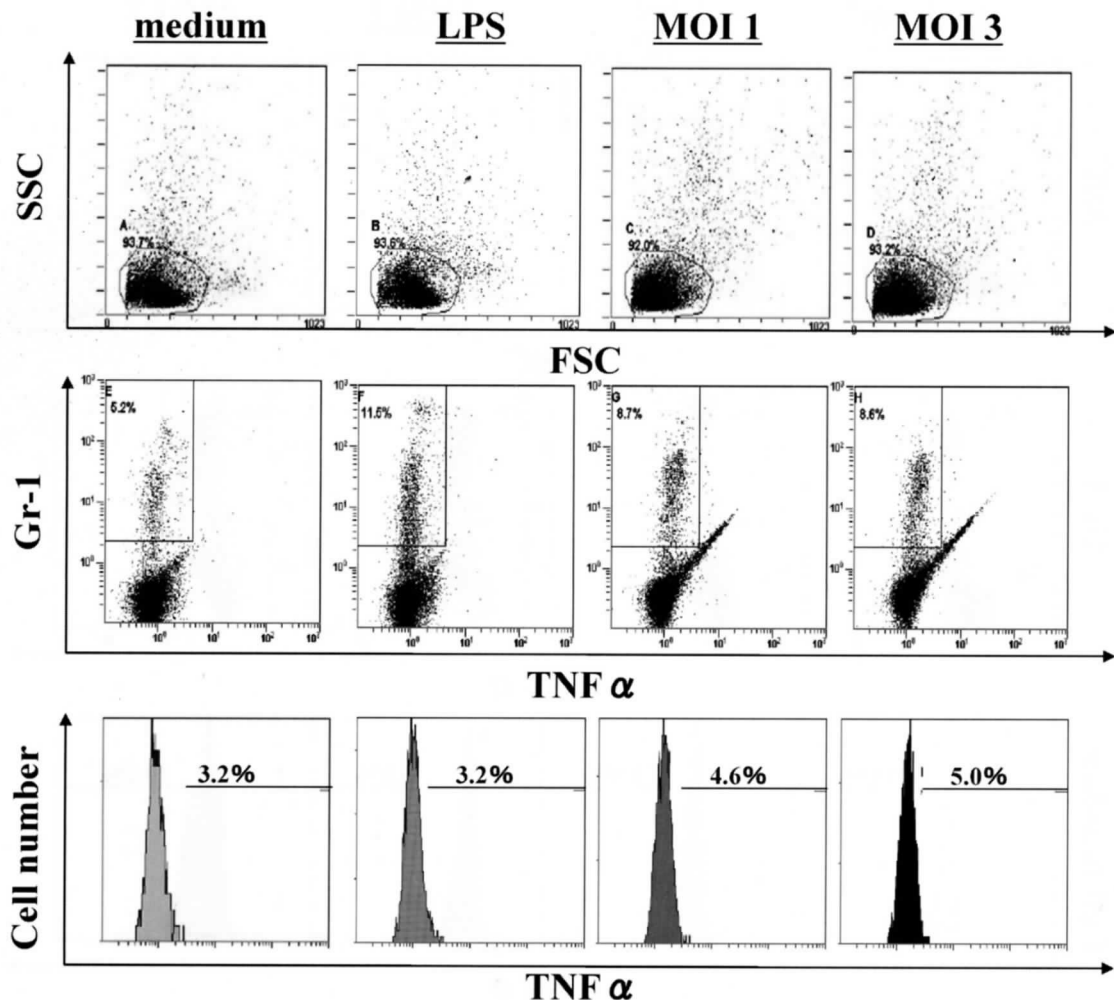


図 3. 脾細胞における細胞培養 24 時間後のフローサイトメトリ解析
C57BL/6 マウスから脾細胞を採取し、肺炎球菌 (MOI 1, MOI 3) や LPS (1 μ g/ml) と共に 24 時間培養を行った。その後、細胞を回収し、フローサイトメトリを用いて、図上段の FSC/SSC において線で囲んだ領域にゲートをかけて解析した。下段は中段の四角で囲った領域での TNF- α 発現細胞を解析した。陽性領域はアイソタイプコントロール IgG を基準に決定した。MOI: multiplicity of infection.

あることを示唆する結果を得た。さらに、骨髄細胞で分化・増殖した TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞は、TNF- α を骨髄のような不必要な場所では放出せず、感染局所でのみ放出するという非常に理にかなったメカニズムを持つことが示唆された。

好中球の分化・増殖は、炎症による刺激によって骨髄で急速に起き、その調節には G-CSF が関

与しているという報告がされている¹⁵⁾。本研究での *in vivo* の実験結果では、肺炎球菌感染において骨髄で TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の増加が見られたが、骨髄や血液中からは肺炎球菌は検出されなかった(未発表データ)。臨床的に、肺炎球菌肺炎症例、あるいは、小児の咽頭コロニゼーション症例で、尿中に肺炎球菌抗原が検出されること

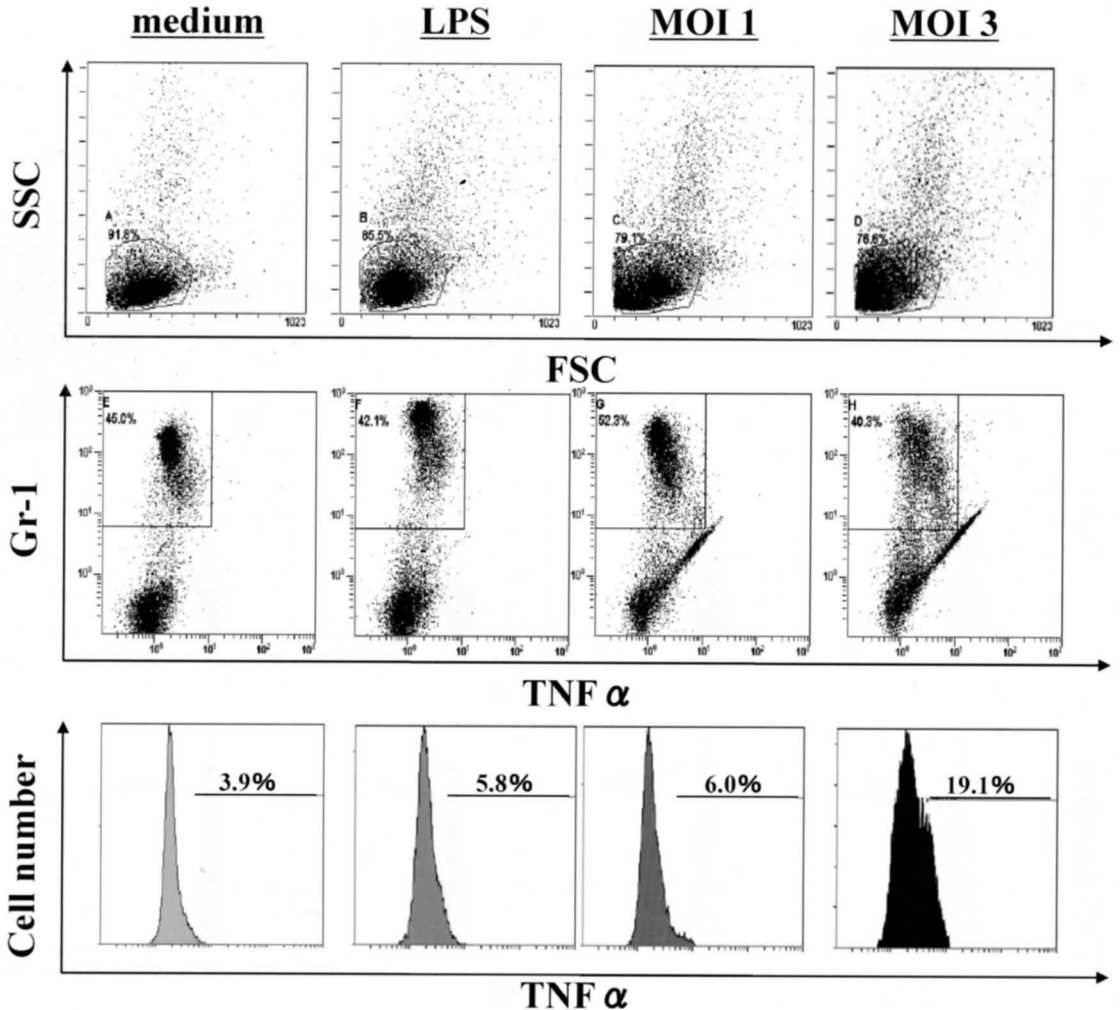


図4. 骨髄細胞における細胞培養24時間後のフローサイトメトリー解析
C57BL/6 マウスから骨髄細胞を採取し、肺炎球菌 (MOI 1, MOI 3) や LPS (1 μ g/ml) と共に24時間培養を行った。その後、細胞を回収し、フローサイトメトリーを用いて、図上段の FSC/SSC において線で囲んだ領域にゲートをかけて解析した。下段は中段の四角で囲った領域での TNF- α 発現細胞を解析した。陽性領域はアイソタイプコントロール IgG を基準に決定した。MOI: multiplicity of infection.

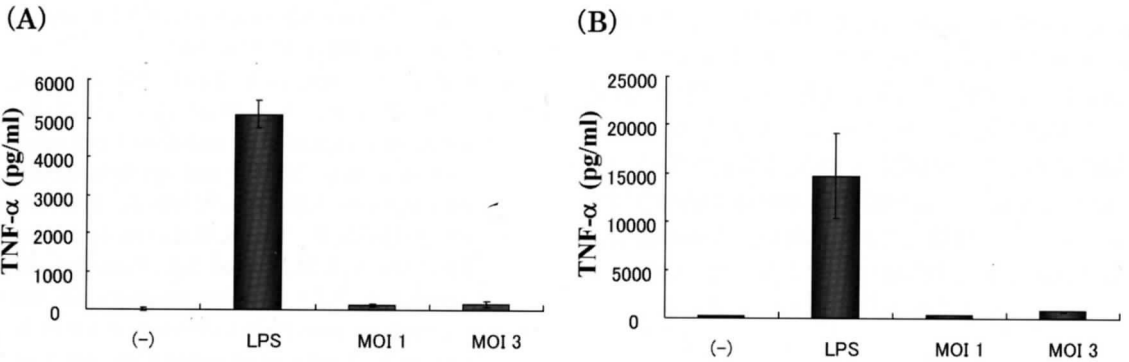


図5. 各種細胞培養上清中の TNF- α 測定

C57BL/6 マウスから脾細胞 (A) および骨髄細胞 (B) を採取し、肺炎球菌 (MOI 1, MOI 3) や LPS (1 μ g/ml) と共に 24 時間培養を行い、その培養上清中の TNF- α 濃度を測定した。グラフは平均値 \pm SD ($n=3$) を示す。脾細胞、骨髄細胞共に、LPS においては培養上清中に TNF- α が検出されたが、肺炎球菌刺激においてはほとんど検出されなかった。MOI: multiplicity of infection.

から^{16,17)}、肺炎球菌自体ではなく何らかの肺炎球菌由来のコンポーネント (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) が肺から骨髄に到達し、骨髄細胞のパターン認識受容体を刺激するために TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の分化・増殖が起これと考えている。

脾臓における好中球の分化・増殖は、骨髄の発達していない胎生期や骨髄線維症などの骨髄機能低下による場合に起こるとされ、通常であれば、好中球の分化は脾臓では起こらない。今回、脾細胞において、*in vivo* の実験では TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞の増加が見られるが、*in vitro* の実験では見られないという結果の相違は、肺炎球菌感染によって骨髄細胞で急速に分化・増殖した TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が血流に乗り感染局所に到達する途中で脾臓を経由しているためだと考える。脾臓を経由する理由は定かではないが、骨髄で作られた血液細胞は一度脾臓に蓄えられるという報告もあることから¹⁸⁾、その時に脾臓に貯蔵された TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞がフローサイトメトリーで検出されたと考える。

TNF- α は好中球の細胞内に前駆物質として蓄積された後、細胞膜を通して分泌される^{19,20,21)}。つまり、フローサイトメトリーによって細胞内に TNF- α の発現が認められたとしても、活性型

TNF- α として必ずしも分泌されているわけではないという可能性が考えられる。今回の *in vitro* の実験において、肺炎球菌刺激における骨髄細胞では TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞が増加しているにも関わらず、その培養上清に TNF- α が検出されなかったことから、この可能性が十分に示唆される。また、*in vivo* の実験において、LPS をマウスに静脈投与することで、投与後 1 時間と急早期に血清中の TNF- α がピークを迎えることから²²⁾、肺炎球菌未感染の状態では脾臓や骨髄に 3% 前後存在している TNF- α 産生 Gr-1 陽性細胞のような細胞が、外界からの刺激に対して早期に TNF- α を放出するために、ある程度 TNF- α を蓄えていると考えられる。これまでの研究で我々は、肺炎球菌感染後の肺内における TNF- α 産生や好中球の集積に、NKT 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞が重要な役割を担うことを明らかにしており^{23,24)}、今後は感染局所でのみ TNF- α を分泌する Gr-1 陽性細胞のメカニズムをこれら細胞の関与を考慮に入れつつ検討して行く予定である。

今回フローサイトメトリー解析で用いた PE 標識抗 Gr-1 抗体は、Ly-6G と Ly-6C の 2 つの GPI 結合膜型糖タンパクを抗原として認識している。近年の研究で、Ly-6G と Ly-6C を発現している細胞はそれぞれ異なる機能を持った細胞集団とさ

れ、単純に Gr-1 陽性細胞を好中球として捉えることができないという報告がされている^{25,26)}。今回の我々の実験では、PE 標識抗 Gr-1 抗体のみでしか検討を行っていないため、検出された Gr-1 陽性細胞が Ly-6G 陽性の顆粒球系細胞集団であるのか、それとも Ly-6C 陽性の単球系細胞集団であるのかまでは特定できていない。今後の課題として、Gr-1 陽性細胞についてもさらなる詳細な検討を行っていかねばならないと考える。

謝 辞

本研究の一部は、厚生労働科学研究費補助金新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業(19-新興-005)から補助を受けた。

文 献

- Gant, V., Parton, S.: Community-acquired pneumonia, *Curr. Opin. Pulm. Med.*, **6**, 226-233, 2000
- Marrie, T.J.: Pneumococcal pneumonia: epidemiology and clinical features, *Semin. Respir. Infect.*, **14**, 227-236, 1999
- Cunha, B.A.: Clinical relevance of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, *Semin. Respir. Infect.*, **17**, 204-214, 2002
- Musher, D., Cohen, M., Baker, C.: Immune responses to extracellular bacteria, In *Clinical immunology, Principles and Practice*, Rich, R.R., Fleisher, T.A., Schwartz, B.D., Shearer, W.T., Strober, W., eds. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis, MO, p 479-502, 1996
- Driscoll, K.E., Hassenbein, D.G., Howard, B.W., Isfort, R.J., Cody, D., Tindal, M.H., Suchanek, M., Carter, J.M.: Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen, *J. Leukoc. Biol.*, **58**, 359-364, 1995
- Rossi, D., Zlotnik, A.: The biology of chemokines and their receptors, *Annu. Rev. Immunol.*, **18**, 217-242, 2000
- Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., Lesslauer, W.: Tumor necrosis factor- α (TNF- α)-induced cells adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55, *J. Exp. Med.*, **177**, 1277-1286, 1993
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., Maniatis, T.: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers, *FASEB J.*, **9**, 899-909, 1995
- Broug-Holub, E., Toews, G.B., van Iwaarden, J.F., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Paine 3rd, R., Standiford, T.J.: Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival, *Infect. Immun.*, **65**, 1139-1146, 1997
- Ferrante, A., Martin, A.J., Bates, E.J., Goh, D.H., Harvey, D.P., Parsons, D., Rathjen, D.A., Russ, G., Dayer, J.M.: Killing of *Staphylococcus aureus* by tumor necrosis factor- α -activated neutrophils. The role of serum opsonins, integrin receptors, respiratory burst, and degranulation, *J. Immunol.*, **151**, 4821-4828, 1993
- van der Poll, T., Keogh, C.V., Buurman, W.A., Lowry, S.F.: Passive immunization against tumor necrosis factor- α impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **155**, 603-608, 1997
- Rijneveld, A.W., Florquin, S., Branger, J., Speelman, P., van Deventer, S.J.H., van der Poll, T.: TNF- α compensates for the impaired host defense of IL-1 type I receptor-deficient mice during pneumococcal pneumonia, *J. Immunol.*, **167**, 5240-5246, 2001
- Beutler, B., Cerami, A.: The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response, *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 625-655, 1989
- Hatta, M., Yamamoto, N., Miyazato, A., Ishii, K., Nakamura, N., Inden, K., Aoyagi, T., Kunitshima, H., Hirakata, Y., Suzuki, K., Kaku, M., Kawakami, K.: Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1⁺ CD11b⁺ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs,

- FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2009 Nov 10. [Epub ahead of print]
- 15) Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., Link, D.C.: G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood, *Immunity*, **17**, 413-423, 2002
- 16) Coonrod, J.D.: Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases, *Am. J. Med.*, **75**, 85-92, 1983
- 17) Smith, M.D., Derrington, P., Evans, R., Creek, M., Morris, R., Dance, D.A., Cartwright, K.: Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 2810-2813, 2003
- 18) Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., Aikawa, E., Mempel, T.R., Libby, P., Weissleder, R., Pittet, M.J.: Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites, *Science*, **325**, 549-550, 2009
- 19) Bennouna, S., Denkers, E.Y.: Microbial antigen triggers rapid mobilization of TNF- α to the surface of mouse neutrophils transforming them into inducers of high-level dendritic cell TNF- α production, *J. Immunol.*, **174**, 4845-4851, 2005
- 20) Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P.: A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells, *Nature*, **385**, 729-733, 1997
- 21) Black, R.A.: Tumor necrosis factor- α converting enzyme, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **34**, 1-5, 2002
- 22) Zuckerman, S.H., Bendele, A.M.: Regulation of serum tumor necrosis factor in glucocorticoid-sensitive and -resistant rodent endotoxin shock models, *Infect. Immun.*, **57**, 3009-3013, 1989
- 23) Kawakami, K., Yamamoto, N., Kinjo, Y., Miyagi, K., Nakasone, C., Uezu, K., Kinjo, T., Nakayama, T., Taniguchi, M., Saito, A.: Critical role of V α 14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection, *Eur. J. Immunol.*, **33**, 3322-3330, 2003
- 24) Nakasone, C., Yamamoto, N., Nakamatsu, M., Kinjo, T., Miyagi, K., Uezu, K., Nakamura, K., Higa, F., Ishikawa, H., O'Brien, R.L., Ikuta, K., Kaku, M., Fujita, J., Kawakami, K.: Accumulation of gamma/delta T cells in the lungs and their roles in neutrophil-mediated host defense against pneumococcal infection, *Microbes Infect.*, **9**, 251-258, 2007
- 25) Matsuzaki, J., Tsuji, T., Chamoto, K., Takeshima, T., Sendo, F., Nishimura, T.: Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo, *Cell. Immunol.*, **224**, 98-105, 2003
- 26) Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., Albina, J.E.: Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice, *J. Leukoc. Biol.*, **83**, 64-70, 2008

